云　南　植　物　研　究　2002，24（5）：651～655
Acta Botanica Yunnanica

长柔毛野豌豆编码甘油－3－磷酸酰基转移酶基因的克隆及序列分析*

吕燕波[1]，陈善娜[1]**，鄢　波[2]，杨明挚[1]，黄兴奇[2]
（1 云南大学生物系，云南 昆明　650091；2 云南省农业科学院生物技术研究所，云南 昆明　650223）

摘要：甘油－3－磷酸酰基转移酶（GPAT）基因与植物抗冷性密切相关。克隆到的长柔毛野豌豆（*Vicia villosa*）GPAT 基因的编码区完整的 cDNA 片段长 1377bp，编码 458 个氨基酸残基，与蚕豆（*Vicia faba*）和豌豆（*Pissum sativum*）比较，其核苷酸序列的同源性分别为 94.1%和 93.3%，氨基酸序列的同源性分别为 96.9%和 98.0%。

关键词：长柔毛野豌豆；甘油－3－磷酸酰基转移酶；cDNA；植物抗冷性
中图分类号：Q 946　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700(2002)05－0651－05

Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA for the Glycerol-3-phosphate Acyltsansferase from *Vicia villosa*

Lü Yan-Bo[1]，CHEN Shan-Na[1]，YAN Bo[2]，YANG Ming-Zhi[1]，HUANG Xing-Qi[2]
（1 *Biology Department*，*Yunnan University*，Kunming 650091，China；2 *Institute of Biotechnology*，*Yunnan Academy of Agricultural Sciences*，Kunming 650223，China）

Abstract：Glycerol-3-phosphate acyltransferase（GPAT）gene is closely relative to the chilling-resistance of plants. We isolated the cDNA encoding the GPAT from *Vicia villosa* cotyledons. The cDNA fragement includes the whole coding region，which contains 1377 base pairs and codes 458 amino acids. Comparing to *Vicia faba* and *Pissum sativum*，the cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of *Vicia villosa* GPAT gene have 94.1% and 93.3%，96.9% and 98.0% homology respectively.

Key words：*Vicia villosa*；Glycerol-3-phosphate acxyltransferase（GPAT）；cDNA；Plant chilling-resistance

冷伤害是导致作物减产甚至死亡的主要原因之一。至今尚未找到根本的解决途径。探索植物抗冷性的生理机制及其遗传因素具有重要的意义。植物生物膜中磷酯酰甘油（phosphatidylglycerol，PG）分子的饱和程度与植物抗冷性密切相关（Murata，1983；1984）。

* 基金项目：云南省自然科学基金（95C008M）和国家自然科学基金（3976001）及云南省农科院生物技术研究所开放实验室基金资助项目
** 通讯联系人
收稿日期：2002－01－06，2002－06－14 接受发表
作者简介：吕燕波（1975－）女，硕士研究生，主要从事基因克隆及血细胞分析工作（现在成都军区昆明总医院检验科）。

甘油-3-磷酸酰基转移酶（glycerol-3-phosphate acyltransferase）是PG生物合成过程中的第一个酰基酯化酶，它将脂肪酰基转移到甘油-3-磷酸的C-1位上合成1-酰基-Sn-甘油-3-磷酸（溶血磷酯酸），来源于抗冷性不同的植物的GPAT对底物酰基具有不同的选择性，对决定植物生物膜中PG的饱和度起着关键作用（Frentzen，1983）。Murata（1992）等通过把抗冷植物拟南芥菜中的GPAT基因转到冷敏感植物烟草中，得到了抗冷性较强的烟草植株，这一实验揭示了一条通过基因工程技术培育抗冷植物品种的途径。

目前，国内外已先后从南瓜（Ishizaki，1988）、豌豆（weber，1991）、黄瓜（Thomas，1992）拟南芥菜（Nishida，1993）、红花（Bhilla，1994）、水稻（刘继梅，1998）、黑子南瓜（杨明挚，1999）、蚕豆（Liu Jimei，1999）等植物中获得了该基因的全长或部分cDNA片段。笔者等依据国外报道的豌豆（豌豆属）GPAT基因cDNA序列，应用RT-PCR技术分离到了长柔毛野豌豆（野豌豆属，有较强的抗冷性）的GPAT基因的全长cDNA片段，并亚克隆到了PGEM-T载体系统的多克隆位点上，进行了序列分析。本文首次报道了该基因的克隆及其序列。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料：长柔野豌豆（*Vicia villosa*）种子购自云南省种子公司

1.1.2 菌株和载体：转化受体菌为大肠杆菌DH5α，克隆载体为pGEM-T系统。

1.1.3 试剂：cDNA合成试剂盒购自GIBCOBRL公司，质粒提取试剂盒购自华舜公司，限制性内切酶及克隆载体pGEM-T系统购自Promega公司，TaqDNA多聚酶及其它分子生物学试剂购自华美公司。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的培养：长柔毛野豌豆于25℃下避光萌发5 d后，光照12 h，取子叶为试验材料。

1.2.2 总RNA的提取：参照异硫氰酸胍法，略加改动。

1.2.3 cDNA第一链的合成：按GIBCOBRL公司合成试剂盒操作说明进行。以总RNA为模板，Oligo（dT）为引物，在逆转录酶的作用下合成cDNA第一链，于－20℃保存。

1.2.4 引物合成：依据豌豆GPAT基因cDNA序列，设计并委托Cybersyn公司合成如下引物：

Primer 1：5′－ATGACCGATTCTTTCGCTC －3′

Primer 2：5′－CTACTTCCATGGCTGTG －3′

1.2.5 用以上合成的cDNA第一链作为模板，用Primery 1和Primer 2进行PCR反应，条件为94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 2 min；35个循环后，72℃再延伸7 min。

1.2.6 克隆：PCR产物纯化后，分别克隆到pGEM-T载体系统的多克隆位点上，转化大肠杆菌DH5α并在X-gal和含氨苄青霉素的平板上筛选白色菌落。重组子委托Cybersyn公司进行测序。

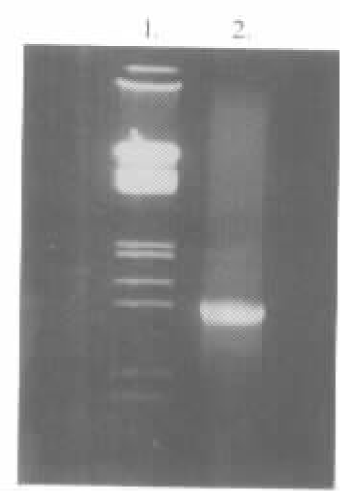


图1 长柔毛野豌豆GPAT基因扩增结果，在1.3kb处有扩增带
1．λDNA Hind Ⅲ/EcoRI 标准分子量
2．扩增产物

Fig.1 Amplification of *Vicia villosa* GPAT gene using PCR
1．λDNA Hind Ⅲ/EcoRI Marker
2．Amplification result

2　结果

以合成的长柔毛野豌豆 cDNA 第一链为模板，用引物 primer 1 和 primer 2 PCR 扩增长柔毛野豌豆 GPAT 基因，1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，在 1.3 kb 处有扩增带（图 1）。

长柔毛野豌豆 GPAT 基因 cDNA 序列及其递推的氨基酸序列（图 2）。

长柔毛野豌豆 GPAT 基因及其递推的氨基酸序列中与蚕豆、豌豆不同的密码子和氨基酸残基（表 1）。

表 1　长柔毛野豌豆 GPAT 基因及其递推氨基酸序列中与蚕豆、豌豆不同的密码子和氨基酸残基

Table 1　Different codons and amino acid residues among *Vicia villosa*、*vicia faba* and *Pissum sativum* GPAT genes and their deduce amino acid residues

差异位点（位） different sites	长柔毛野豌豆 *Vicia villosa*		蚕豆 *Vicia faba*		豌豆 *Pissum sativum*	
	密码子 codons	氨基酸残基 amino acids	密码子 codons	氨基酸残基 amino acids	密码子 codons	氨基酸残基 amino acids
132	GAA	E	CAA	Q	GAA	E
184	GAG	E	GGG	G	GAG	E
247	TTG	L	ATG	M	ATG	M
248	CGA	R	CAA	Q	CGA	R
251	CAG	Q	CAT	H	CAT	H
267	GAT	D	GTA	V	GTA	V
295	ATA	I	ATA	I	GTA	V
306	CTG	L	CTG	L	CGG	R
311	ACG	T	ACA	T	ATG	M
329	GGT	G	GAT	D	GAT	D
408	AGC	S	AGT	S	AAC	N
409	ATC	I	ACC	T	ACC	T
418	ACG	T	ACG	T	AAG	K
424	TCA	S	ACA	T	ACA	T
436	GAA	E	GAT	D	GAT	D

3　讨论

长柔毛野豌豆和蚕豆同属豆科野豌豆属，而豌豆属豆科豌豆属。长柔毛野豌豆为一年生草本植物，为优良饲料且具绿肥作用，广布于云南许多高寒地区，其抗冷性较蚕豆、豌豆的强。克隆到的长柔毛野豌豆 GPAT 基因 cDNA 片段长 1377bp，编码 458 个氨基酸残基。与蚕豆和豌豆比较，其核苷酸序列的同源性分别为 94.1%和 93.3%，氨基酸序列的同源性分别为 96.9%和 98.0%。与已知其它物种 GPAT 基因比较，预测从 1 至 89 个氨基酸残基为转移肽（transit peptide，TP），它具有转移肽的一些显著特征：丝氨酸（Ser）和苏氨酸（Thr）含量很高（32.6%），而酸性氨基酸（Asp 和 Gln）含量低（2.2%）；而且，因为酸性氨基酸含量低而具净正电荷（89 个残基中有 11 个碱性氨基酸残基，而只有 2 个酸性氨基酸）。比较长柔毛野豌豆、蚕豆和豌豆 GPAT 基因 cDNA 递推的氨基酸序列，发现有 15 个氨基酸残基不同。其中，有 7 个在不同属植物蚕豆、豌豆中一致的位点，在长柔毛野豌豆中出现了差异。这 7 个位点分别是：247，251，267，329，409，424 和 436。由于这些氨基酸残基本身结构和特性的不同，将一定程度上导致长柔野豌豆与蚕豆、豌豆 GPAT 的空间立体结构不同，这些氨基酸差异可能与这 3 种植物间的抗冷性差异有关。

1 ATG ACC GAT TCT TTC GCT CAC TAC GCG TCA CGC ATT AAT TAC CGC CAC ACA AGC AAA ACC

M T D S F A H Y A S R I N Y R H T S K T

61 ATG TCT ATC TTC TCC ACT CCG TGT TGT TCT CCT TCC ACC GCA TTT TTC TCG CCA TTT AGG

M S I F S T P C C S P S T A F F S P F R

121 GCT TCA AAT TCT AAA CCT CTT CTT CGT TCT TCC ACT CTC TGT CTT CGA TCT TCA ACT TCT

A S N S K P L L R S S T L C L R S S T S

181 TCT ATA ACT TCC ACT TCT AAC CAC TGT TCT CTC GCT TTC AAC ATT GTT AAA CCT AAA GAG

S I T S T S N H C S L A F N I V K P K E

241 AAA AAC GTT GTT TTC GCT AAT ATG ACT TCT TCC GTT TCG TCT CGC ACT TTT CTC AAT GCT

K N V V F A N M T↓ S S V S S R T F L N A

301 CAA AAT GAA CAA GAT GTT CTT TCT GGG ATT AAG AAA GAA GTA GAA GCG GGA ACT TTG CCT

Q N E Q D V L S G I K K E V E A G T L P

361 GCT AGT ATT GCT GCA GGG ATG GAA GAA GTG TAC CTT AAC TAT AAA AGT GCA GTT ATT AAA

A S I A A G M E E V Y L N Y K S A V I K

421 AGT GGA GAT CCC AAA GCA AAT GAA ATT GTA TTG TCA AAT ATG ACT GCC TTA TTA GAT CGC

S G D P K A N E I V L S N M T A L L D R

481 ATA TTT TTG GAT GTG AAG GAG CCT TTT GTC TTT GAA GCA CAC CAC AAA GCA AAG AGA GAG

I F L D V K E P F V F E A H H K A K R E

541 CCT TTT GAT TAC TAC ATG TTT GGT CAA AAT TAT ATT CGC CCC TTA GTT GAT TTC GAA ACT

P F D Y Y M F G Q N Y I R P L V D F E T

601 TCT TAT GTC GGT AAC ATG CCC CTT TTC ATT CAA ATG GAA GAG CAA CTT AAG CAG GGG CAC

S Y V G N M P L F I Q M E E Q L K Q G H

661 AAT ATT ATC TTG ATG TCA AAC CAC CAA AGT GAA GCA GAT CCA GCT ATC ATT GCA TTG CTG

N I I L M S N H Q S E A D P A I I A L L

721 CTT GAA TTG CGA CTT CCC CAG ATT GCT GAG AAC TTG ATA TAT GTA GCA GGA GAT AGA GTT

L E L R L P Q I A E N L I Y V A G D R V

781 ATA ACT GAT CCT CTA TGC AAG CCC TTC AGT ATT GGC AGG AAT CTG ATC GTT TGT TAT TCG

I T D P L C K P F S I G R N L I C V Y S

841 AAA AAG CAC ATG CTT GAT AAT CCA GAA CTT ATA GAT ATG AAA AGA AAG GCA AAT ACT AGA

K K H M L D N P E L I D M K R K A N T R

901 AGT CTG AAG GAA ATG GCT ACG CTT TTA AGG AGT GGA TCA CAA ATA ATT TGG ATT GCC CCA

S L K E M A T L L R S G S Q I I W I A P

961 AGT GGC GGT AGG GGT CGA CCA GTT GCC AAC TCT GGG GAA TGG GCA CCG GCA CCC TTT GAT

S G G R G R P V A N S G E W A P A P F D

1021 TCT TCT TCA GTG GAT AAT ATG CGA AGG CTT GTC GAT CAT TCA GGT CCA CCA GGT CAT ATC

S S S V D N M R R L V D H S G P P G H I

1081 TAT CCT TTG GCT ATA TTG TGC CAT GAT ATA ATG CCC CCT CCA TTA AAG GTC GAA AAA GAA

Y P L A I L C H D I M P P P L K V E K E

1141 ATT GGG GAG AAA AGA ATT ATA TCC TAT CAT GGG ACT GGC ATA TCA ACG GCT CCA GAA ATA

I G E K R I I S Y H G T G I S T A P E I

1201 AGC TTT TCC AGC ATC ACT GCT GCT TGT GAA AAT CCT GAA ACG GCC AAG GAT GCT TAT TCA

S F S S I T A A C E N P E T A K D A Y S

1261 AAA GCA TTG TAT GAT TCT GTG ACC GAG CAA TAT GAA GTG CTG AAG TCT GCT ATA CAC GGT

K A L Y D S V T E Q Y E V L K S A I H G

1321 AAA AAA GGA TTA CAA GCA TCA ACT CCT GTA GTT TCA TTG TCA CAG CCA TGG AAG TAG

K K G L Q A S T P V V S L S Q P W K

图2 长柔野豌豆 GPAT 基因 cDNA 序列及其递推的氨基酸顺序，箭头所指处为预期的剪切位点

Fig. 2 cDNA and its deduced amino acid sequence of GPAT gene from *Vicia villosa*. An arrow indicates the predicted processing site.

这是国内首次从抗冷性较强的植物中克隆到含有编码转移肽的核苷酸序列的完整的GPAT基因cDNA片段。长柔毛野碗豆GPAT基因的分离克隆对研究该基因和该酶以及了解植物的抗冷机制，进而运用基因工程技术改变农作物的抗冷性有重要的意义。

〔参　考　文　献〕

Liu JM（刘继梅），Chen SN（陈善娜），Yan Bo（鄢波），*et al*，1998. Cloning and sequencing of a part-length cDNA coding for glycerol-3-phosphate acyltransferase from rice [J]. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究），**20**（3）：339—342

Yang MZ（杨明挚），Chen SN（陈善娜），Yan Bo（鄢波），*et al*，1999. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for the glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Cucurbita ficifolia* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究），**21**（2）：139—143

Bhilla RS，Mackenzie SL，1994. Nuceotide squeuce of a cDlNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycer-3-phosphate acyltransferase [J]. *Plant Physial*，**106**（4）：1713—1714

Frentzen M，Heinz E，Mekeon A，*et al*，1983. Specification and selecfive of GPAT and MAPAT from pea and spinach chlorplasts [J]. *FEBS LETTER*，**129**：625

Ishizaki O，Nishida I，Agota K，*et al*，1988. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for the plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase from squash [J]. *FEBS LETTER*，**23**（2）：424

Liu JM，Chen SN，*et al*，1999. Cloning and sequencing of the cDNA coding for Glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Vicia faba* [J]. *Plant Gene Register*，6，PCR 99—94

Murata N，1983. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. *Plant Cell Physiol*，**24**：81

Murata N，Yamaya J，1984. Temperature-dependent phase be havior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plant [J]. *Plant Physiol*，**74**：1016

Murata N，Nishida I，Ishizaki-Nishizawa O，*et al*，1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plant [J]. *Nature*，**356**：710—713

Nishida I，Tasaka Y，shiraishi H，*et al*，1993. The gene and the RNA for the precursor to the plastidlocated glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecurlar Biology*，**21**：267—277

Thomas C，Johnson，Jane C，*et al*，1992. Nucleotide sequence of acyl carrier protein：glycerol-3-phosphate acyltransferase from Cucumber [J]. *Plant Physiol*，**99**：771—772

Weber S，Wolter FP，*et al*，1991. Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-CP：sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts [J]. *Plant Molecular Biology*，**17**：1067—1076